

Nguyen-Ba-Vy ¹Y. Leforban ²J. P. Gillet ³P. Théry ³

Identification d'oviadénovirus type 5 sur des chèvres du Sénégal

NGUYEN-BA-VY, LEFORBAN (Y.), GILLET (J. P.), THÉRY (P.).
Identification d'oviadénovirus type 5 sur des chèvres du Sénégal.
Revue Elev. Méd. vét. Pays trop., 1988, 41 (1) : 35-39.

Cinq souches de virus, isolées au Sénégal à partir de chèvres présentant des signes cliniques de peste des petits ruminants, ont été identifiées comme des oviadénovirus type 5 ayant des propriétés physico-chimiques classiques et la morphologie caractéristique sous microscopie électronique. Leur sérotype a été déterminé par la séroneutralisation avec des antisérums de référence. La synergie de leur pouvoir pathogène avec d'autres agents est discutée. *Mots clés* : Chèvre - Oviadénovirus - Identification - Sénégal.

INTRODUCTION

Plusieurs souches d'oviadénovirus ont été isolées des moutons en Irlande par McFERRAN *et al.* (14), en Écosse par SHARP *et al.* (17), en Turquie par BAUER et collab. (3), en France par RUSSO et collab. (16). La majorité d'entre elles a pu être classée par ADAIR et McFERRAN en 1976 (1) dans 5 sérotypes. Deux nouveaux sérotypes ont été distingués par DAVIES et HUMPHREYS en 1977 (7) sur des moutons de la Nouvelle-Zélande. GIBBS *et al.* (9) ont isolé des chèvres malades au Nigeria, 2 sérotypes de capriadénovirus qui se sont révélés différents des oviadénovirus. Ces 2 genres de virus n'ont pas une spécificité d'hôte stricte, ils peuvent infecter plusieurs espèces animales différentes. Dans cet article, sont relatés les résultats des travaux d'identification d'un oviadénovirus sur des chèvres présentant des signes cliniques de peste des petits ruminants au Sénégal.

1. IEMVT-CIRAD, laboratoire de Virologie, service de Pathologie Infectieuse, 10 rue Pierre Curie, 94704 Maisons-Alfort Cedex, France.

2. LNERV, Institut sénégalais de Recherche Agricole, BP 1053, Dakar-Hann, Sénégal.

Adresse actuelle : Station de Pathologie Porcine, BP 9, 22440 Ploufragan, France.

3. Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, Service Histopathologie et Microscopie électronique, ministère de l'Agriculture, Direction Générale de l'Alimentation des Services Vétérinaires, 22 rue Pierre Curie, BP 67, 94703 Maisons-Alfort Cedex, France.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Origine des souches de virus

En 1983-1984, de nombreux foyers de peste des petits ruminants sont apparus sur des chèvres du Sénégal. LEFORBAN et collab. (12) ont utilisé des broyats d'organes (rates, ganglions, poumons) ou des raclages de la muqueuse intestinale des animaux malades, pour ensemercer des cultures de cellules rénales de foetus ovins.

Des effets cytopathiques ont été observés dans un délai de 2 à 8 jours suivant la première ou plus souvent la deuxième sub-culture. Cinq souches de virus ont ainsi été isolées et confiées au laboratoire de Virologie de l'IEMVT pour identification : les souches C₃₁ et C₃₂ proviennent de 2 chèvres du foyer de Thyssé-Kayemor, alors que les souches C₃₆, C₃₇ et C₃₈, de 3 chèvres du foyer de Kaffrine. Un broyat de rates, poumons et ganglions des chèvres C₃₁ et C₃₂ a été inoculé par voie sous-cutanée, au laboratoire de Dakar-Hann à la chèvre C₄₀. Cette dernière a été sacrifiée à l'agonie au 6ème jour post-inoculation et une souche de virus a été réisolée à partir de la rate, du poumon, des ganglions et d'un raclage de la muqueuse intestinale de l'animal. Du sang de cette même chèvre, prélevé à la phase d'hyperthermie, a été injecté par voie intraveineuse à une seconde chèvre n° C₄₂, ce qui a permis la reproduction des symptômes et le réisolement du virus à partir des organes. Il est important de noter que les animaux d'expérience n° C₄₀ et C₄₂ ont présenté les mêmes signes que les animaux sur lesquels ont été prélevés les organes ayant servi à leur inoculation, à savoir : hyperthermie, syndrome typhique et diarrhée se terminant par la mort.

Tests biologiques

Culture cellulaire

Les cellules rénales et testiculaires des foetus de bovin et de mouton sont cultivées avec du milieu MEM additionné de 0,6 p. 100 d'hydrolysate de lactalbumine (Difco) et enrichi respectivement avec 7 p. 100 de

Nguyen-Ba-Vy, Y. Leforban, J. P. Gillet, P. Théry

sérum de veau inactivé ou 10 p.100 de sérum d'agneau. On ajoute de la pénicilline G à la dose de 100 U.I./ml et de la kanamycine à 60 µg/ml. Le milieu d'entretien des cellules bovines contient 2 p. 100 de sérum foetal bovin.

Titration du virus

La suspension virale est diluée avec du milieu d'entretien, selon la progression géométrique de raison 10, avant d'être répartie sur des plaques à 96 cupules (Nunc) à la dose de 0,10 ml par cupule et dans 5 par dilution. Les cellules ont été distribuées une nuit à l'avance à la dose de 10 000 cellules par cupule. Au moment de l'emploi, les plaques sont vidées de l'ancien milieu. Le titre viral est calculé selon la méthode de REED et MUENCH.

Titration des anticorps

Les sérums inactivés sont dilués avec du milieu d'entretien, puis mélangés à égal volume avec une suspension virale contenant 1 000 DICC₅₀/ml. Après incubation d'une heure à 37 °C, chaque mélange est réparti à raison de 0,20 ml par cupule et dans 5 cupules. Les cellules sont distribuées une nuit à l'avance.

Les antisérums de référence des 6 premiers sérotypes d'oviadénovirus proviennent du Veterinary Research Laboratories, Stormont, Belfast en Irlande du Nord.

D'autres lots d'hyperimmunsérums ont été fabriqués par le laboratoire de Virologie de l'ITEMVT sur des lapins, avec des suspensions virales traitées au Forane 113.

Tests physico-chimiques

Les différents tests de caractérisation des adénovirus ont été effectués selon la procédure préconisée par HSIUNG (10).

Observation au microscope électronique

Le surnageant des cultures de virus est incubé pendant 1 heure à 37 °C avec un sérum anti-oviadénovirus, dilué à 20 p. 100 (v/v) dans du tampon PBS-pH 7,20. Ce mélange, après un contact de 2 minutes, est étalé sur des grilles traitées au formvar-carbone, puis fixé pendant 1 minute avec une solution à 4 p. 100 de tétroxyde d'osmium en eau distillée, avant d'être contrasté pendant 1 minute avec une solution à 2,5 p. 100 d'acide phosphotungstique en eau distillée. Ces préparations sont observées au microscope électronique JEOL 100 CX II.

Pour la préparation des coupes, des nappes de cellu-

les infectées sont fixées pendant 30 minutes avec une solution de glutaraldéhyde à 2,5 p. 100 en tampon Veronal 0,1 M à pH 7,20, puis post-fixées avec une solution de tétroxyde d'osmium à 1 p. 100 en tampon Veronal. Les cellules sont déshydratées à l'éthanol avant d'être incluses en Epon. Des coupes ultrafines de 60 à 90 nm d'épaisseur, réalisées avec un ultramicrotome Ultracut/Reichert, sont contrastées avec des solutions d'acétate d'uranyle et de citrate de plomb, au moyen d'un automate de coloration Ultrastainer L.K.B.

RÉSULTATS

Multiplication du virus avec effet cytopathique

Les 7 souches de virus C₃₁, C₃₂, C₃₆, C₃₇, C₃₈, C₄₀ et C₄₂ qui avaient subi au Sénégal 2 à 3 passages sur des cellules ovines, se sont multipliées sans difficulté dans le laboratoire de Virologie de l'ITEMVT, sur des cellules rénales et testiculaires de fœtus de mouton et de bovin. Des lésions cytopathiques, cellules rétractées ou arrondies, étaient visibles dès le 2^{ème} jour. La coloration, à différents intervalles après inoculation, des lamelles de cellules infectées, a permis l'observation dans les premières 24 heures, d'inclusions intranucléaires, sous forme d'un ou de plusieurs amas granuleux, semi-éosinophiles. A un stade plus avancé, elles sont devenues basophiles ; leur coalescence ou la rétraction du nucléoplasme faisait apparaître une masse unique basophile et entourée ou non d'un halo bordé par un mince liseré de chromatine. Le cytoplasme éosinophile s'est rétracté autour du noyau nécrosé, avant le stade de décollement cellulaire.

L'infection des cellules au début de la phase de multiplication active, pratiquement dans les 24 heures après leur mise en culture, a fourni des titres de virus variant de 10^{6,3} à 10^{7,2} DICC₅₀/ml (dose infectant 50 p. 100 des cultures cellulaires). L'usage des couches de cellules infectées, âgées de 4 ou 5 jours, a retardé l'effet cytopathique du virus et diminué le rendement final (10²-10^{3,5} DICC₅₀/ml).

Des sous-lignées de cellules d'explantation qui avaient subi une dizaine de sub-cultures se sont également montrées moins favorables à la multiplication du virus.

Absence d'hémagglutinine

Des tests d'hémadsorption et d'hémagglutination avec des suspensions à 0,5 p. 100 d'hématies de poulet, de rat et de cobaye à 4 °C et à la température du laboratoire, ont donné des résultats négatifs pour toutes les souches de virus examinées.

Propriétés physico-chimiques

Ces souches de virus pouvant passer à travers des filtres Millipore de $0,10\ \mu$, ont résisté au traitement au chloroforme à 1/20 pendant 10 minutes à 37°C et à un séjour dans un milieu acide à pH 3 pendant 60 minutes à 37°C . Insensibles à la température de 50°C pendant 60 minutes, elles ont été complètement inactivées par une incubation au bain-marie à 60°C pendant 30 minutes.

La coloration des cellules infectées à l'acridine orangé a mis en évidence dans les noyaux, une fluorescence jaune verdâtre, caractéristique des déoxyribovirus.

Leur culture en présence de $10^{-4}\ \text{M}$ de 5-iodo-2'-déoxyuridine a abaissé leur titre viral de plus de $3\ \log_{10}$ par rapport à ceux des témoins. La thymidine à la dose de $50\ \mu\text{g/ml}$ a supprimé cet effet inhibiteur. La souche D_{47} de la variole des dromadaires, utilisée comme témoin-déoxyribovirus, ne s'est pas multipliée en présence d'IDU.

Observation au microscope électronique

L'examen des suspensions de virus traitées par un sérum anti-oviadénovirus type 5 a montré des amas de particules virales nues (Photo 1) ayant la morphologie typique d'adénovirus et un diamètre approximatif de 75 nanomètres.

Les coupes ultrafines de cellules testiculaires bovines infectées ont permis l'observation des mêmes virions qui sont localisés essentiellement dans le noyau des cellules (Photos 2 et 3) à l'exception de quelques particules intracytoplasmiques.

Sérotypie

Sérotypie avec des antisérums de référence du Laboratoire de Recherches Vétérinaires de Belfast

Les 7 souches de virus ont été neutralisées par des dilutions variant de 1/1024 à 1/2048 du sérum de référence anti- OA_5 dont le titre homologue était de 1/1500. Les sérums anti- OA_1 , OA_4 et OA_6 n'y avaient aucun effet. Les sérums anti- OA_2 et OA_3 dont le titre homologue était de 1/36000, avaient une activité inhibitrice aux dilutions respectives de 1/8 et 1/64. Cette activité peut être considérée comme négligeable car, selon les recommandations du Comité International de Taxonomie des Virus, le classement d'un adénovirus dans un sérotype déterminé exige que le titre hétérologue se trouve dans les limites de 16 fois supérieures ou inférieures au titre homologue de l'antisérum de référence.

Sérotypie avec des antisérums fabriqués par l'ITEMVT

Les 3 antisérums fabriqués sur des lapins à partir des souches C_{40} et C_{42} isolées des chèvres et la souche M_{29} d'un mouton, ont neutralisé ces 7 souches de virus ainsi qu'une souche de référence OA_5 à des dilutions variant entre 1/1024 et 1/2048. La lecture finale a été effectuée au 12ème jour après l'inoculation. Des titres d'anticorps 2 à 4 fois plus élevés ont été notés lors des lectures au 6ème jour.

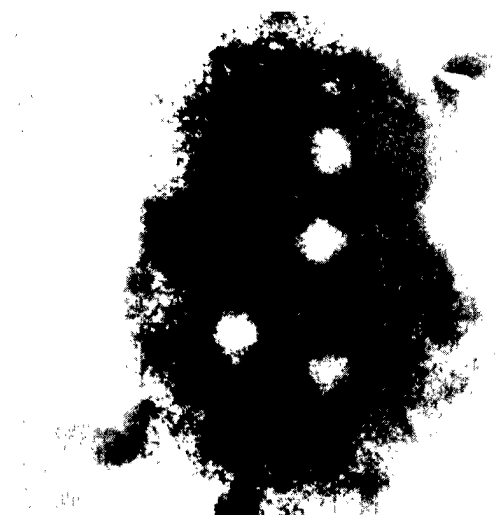


Photo 1 : Virions agglutinés par un sérum anti-oviadénovirus type 5 ($\times 80\ 000$).



Photo 2 : Oviadénovirus type 5 localisés dans le noyau des cellules testiculaires bovines ($\times 10\ 000$).

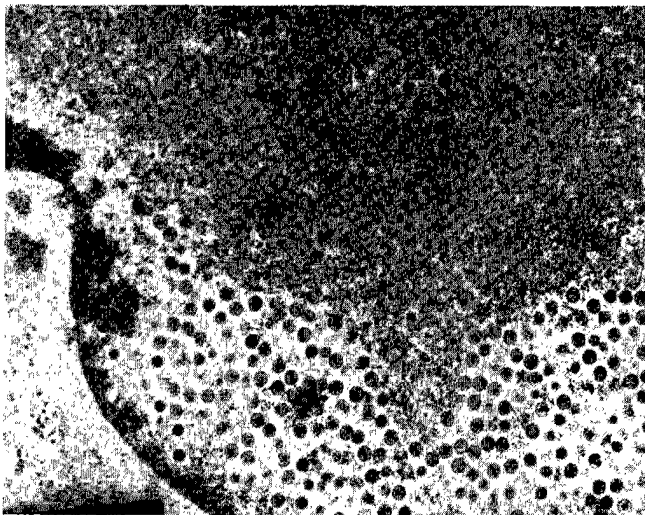


Photo 3 : Oviadénovirus type 5 localisés dans le noyau des cellules testiculaires bovines (x 40 000).

DISCUSSION

Les présents résultats permettent d'identifier les souches de virus isolées des chèvres au Sénégal comme des adénovirus. Il s'agit de mastadénovirus ovin type 5. Des anticorps neutralisants spécifiques ont été décelés aussi sur des chèvres du Cameroun (NGUYEN-BA-VY, non publié).

Les caprins peuvent être infectés aussi bien par des oviadénovirus que par des capriadénovirus. GIBBS *et al.* (9) en ont isolé 2 sérotypes. OBI et TAYLOR (15) ont détecté les anticorps correspondants sur des petits ruminants au Nigeria.

Le pouvoir pathogène des adénovirus des petits ruminants s'est révélé assez faible en tant qu'agent étiologique unique : la plupart des souches n'ont provoqué que des signes cliniques, bénins ou négligeables lors des infections expérimentales (3, 17), bien qu'il y ait eu multiplication du virus avec possibilité de réisolement à partir des sécrétions nasales, des sérosités, des tissus pulmonaires, des ganglions mésentériques et des fèces.

Il a été cependant démontré que certaines souches pouvaient être pathogènes dans les conditions expérimentales : la souche néo-zélandaise WV 757/75 (8) a entraîné de la fièvre, de l'écoulement nasal, de la toux et des lésions pulmonaires bénignes sur des agneaux de 3 mois privés de colostrum. La souche PA/8 du sérotype 5 d'origine hongroise (4) a fait apparaître sur des agneaux de 10 jours privés de colostrum, une

légère réaction fébrile, une décharge nasale, de la conjonctivite et des lésions de rhinite, de pneumonie interstitielle et d'entérite. La souche RTS-42 (13) d'oviadénovirus type 5 d'origine américaine a produit sur des agneaux des zones d'hyperémie et de consolidation au niveau du poumon. Des agneaux orthoxéniques infectés par un aérosol de la souche 7769 d'oviadénovirus type 4 (18) ont montré des lésions d'œdème pulmonaire.

Des symptômes plus graves, plus variés et des lésions plus étendues ont été observés dans des cas de maladie naturelle. Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'action combinée des adénovirus avec d'autres agents pathogènes (virus, bactéries, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, etc.). Leurs effets synergiques s'exercent notamment sur des animaux prédisposés par la malnutrition ou le parasitisme et affaiblis par des facteurs déprimants : mauvaises conditions climatiques, ventilation défectueuse, surpeuplement, etc. Chez les bovins atteints de kératoconjonctivite (19), WILCOX a isolé des souches d'adénovirus en même temps que des *Moraxella bovis* et *Neisseria catarrhalis*. Une infection mixte des poulets par *Mycoplasma gallisepticum* et d'adénovirus a produit des symptômes respiratoires et des lésions plus importants qu'avec chacun d'eux séparément. L'action combinée de *Mycoplasma hyopneumoniae* et d'adénovirus a provoqué une pneumonie plus sévère chez les porcs infectés (11). Lors des cas naturels d'affection respiratoire des chiens par parainfluenza, on a isolé aussi des adénovirus, des *Bordetella bronchiseptica* et des herpèsvirus (5, 6).

Lors des épizooties de peste des petits ruminants au Nigeria (5) et au Sénégal (12), le rôle essentiel du virus de PPR a été confirmé respectivement par l'isolement de ce virus et par la mise en évidence de l'antigène précipitant spécifique dans le poumon et les ganglions de plusieurs chèvres. Mais le rôle des adénovirus régulièrement isolés des organes de ces animaux ne doit pas être sous-estimé. Existe-t-il une action synergique ou potentialisatrice réciproque des deux virus ? Le problème posé demande encore des études expérimentales plus approfondies.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements au Docteur ADAIR du Veterinary Research Laboratories, Stormont, Belfast (Irlande du Nord) qui nous a fourni gracieusement des antisérums et des souches d'oviadénovirus de référence et nous a aidés de ses conseils judicieux pour la sérotypie.

NGUYEN-BA-VY, LEFORBAN (Y.), GILLET (J. P.), THÉRY (P.). Identification of oviadenovirus type 5 on goats in Senegal. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1988, 41 (1) : 35-39.

The five viral strains isolated from Senegalese goats which had clinical signs of *peste des petits ruminants* were identified as oviadenoviruses type 5 with classical physico-chemical properties and characteristic morphology under electronic microscopy. Their serotypes were determined by seroneutralization test with reference antisera. Their pathogenicity in synergic action with other pathogens is discussed. *Key words* : Goat - Oviadenovirus - Identification - Senegal.

NGUYEN-BA-VY, LEFORBAN (Y.), GILLET (J. P.), THÉRY (P.). Identificación de oviadenovirus tipo 5 en cabras del Senegal. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1988, 41 (1) : 35-39.

Se identificaron cinco cepas de virus aisladas de cabras con síntomas de peste de los pequeños rumiantes en Senegal como oviadenovirus tipo 5 teniendo propiedades fisicoquímicas clásicas y la morfología característica bajo microscopía electrónica. Se determinó el serotipo por seroneutralización con antiseros de referencia. Se discute la sinergia de su poder patógeno con otros agentes. *Palabras claves* : Cabra - Oviadenovirus - Identificación - Senegal.

BIBLIOGRAPHIE

1. ADAIR (B. M.), McFERRAN (J. B.). Comparative serological studies with mammalian adenoviruses. *Archs Virol.*, 1976, 51 : 319-325.
2. AGHAKHAN (S. M.), PATTISON (M.). Infection of the chicken with an avian adenovirus and *Mycoplasma gallisepticum*. *J. comp. Path.*, 1976, 86 : 1-9.
3. BAUER (K.), MULLER (H.), GURTURK (S.). Isolierung eines virus von Schafen und seine Einordnung als neuer Serotyp oviner Adenoviren. *Zentbl. VetMed.*, 1975, 22 : 656-665.
4. BELAK (S.), VETESI (F.), PALFI (V.), PAPP (L.). Isolation of a pathogenic strain of ovine adenovirus type 5 and comparison of its pathogenicity with another strain of the same serotype. *J. comp. Path.*, 1980, 90 : 169-176.
5. BIBRACK (B.), BENARY (F.). Seroepizootologische untersuchungen über die Bedeutung von parainfluenza-2 infectionen beim Zwingerhusten in Deutschland. *Zentbl. VetMed.*, 1975, 22 : 610.
6. BINN (L. N.), EDDY (A.), LAZAR (E. C.), HELMS (J.), MURNANE (T.). Viruses recovered from laboratory dogs with respiratory disease. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1967, 126 : 140.
7. DAVIES (D. H.), HUMPHREYS (S.). Characterization of two strains of adenovirus isolated from New Zealand sheep. *Vet. Microbiol.*, 1977, 2 : 97-107.
8. DAVIES (D. H.), HUMPHREYS (S.). Experimental infection of lambs with adenovirus of ovine origin. *Vet. Microbiol.*, 1977, 2 : 67-72.
9. GIBBS (E. P. J.), TAYLOR (W. P.), LAWMAN (M. J. P.). The isolation of adenoviruses from goats affected with peste des petits ruminants. *Res. vet. Sci.*, 1977, 23 : 331-335.
10. HSIUNG (G. D.). Diagnostic virology. 3rd ed. New Haven and London, Yale University Press, 1982.
11. KASZA (L.), HODGES (R. T.), BETTS (A. O.), TREXLER (P. C.). Pneumonia in gnotobiotic pigs produced by simultaneous inoculation of a swine adenovirus and *Mycoplasma hyopneumonia*. *Vet. Rec.*, 1969, 84 : 262-267.
12. LEFORBAN (Y.), CISSOKO (S.), THIOUNE (M.), BUREAM-HUMBERT (F.). Le syndrome peste des petits ruminants chez la chèvre. Observations des foyers et étude expérimentale. Dakar-Hann, Sénégal, Laboratoire National de l'Élevage et de Recherches Vétérinaires, 1984. (Rapport n° 070 VIRO juillet 1984).
13. LEHMKUHL (H. D.), CUTLIP (R. C.). Inoculation of lambs with ovine adenovirus 5 (Mastadenovirus type 5) strain RTS-42. *Am. J. vet. Res.*, 1986, 47 : 724-726.
14. McFERRAN (J. B.), NELSON (R.), KNOX (E. R.). Isolation and characterization of sheep adenoviruses. *Arch. ges. Virusforsch.*, 1971, 35 : 232-241.
15. OBI (T. U.), TAYLOR (W. P.). Serological survey of adenovirus antibodies in domestic animal in Nigeria. *Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis.*, 1984, 7 (1) : 63-68.
16. RUSSO (P.), LAMBERT (M.), GIAUFFRET (A.). Isolement d'un adénovirus chez un agneau atteint d'entérite. *Bull. Acad. vét. Fr.*, 1978, 51 : 183-187.
17. SHARP (J. M.), McFERRAN (J. B.), RAE (A.). A new adenovirus from sheep. *Res. vet. Sci.*, 1974, 17 : 268-269.
18. SHARP (J. M.), RUSHTON (B.), RIMER (R. D.). Experimental infection of specific pathogen-free lambs with ovine adenovirus type 4. *J. comp. Path.*, 1976, 86 : 621-628.
19. WILCOX (G. E.). The aetiology of infectious bovine keratoconjunctivitis in Queensland. 2. Adenovirus. *Aust. vet. J.*, 1970, 46 : 415-420.